

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



FACULTAD DE CIENCIAS
Biblioteca

RESULTADOS OBTENIDOS CON
UNA MODIFICACION A LA REACCION
DE HEMOAGLUTINACION DE
MIDDLEBROOK Y DUBOS
EN NIÑOS CON PROBABLE
TUBERCULOSIS

Tesis para el
examen final de
BIOLOGO
presentada por
RAQUEL LRABIELA

16
CP

MEXICO

1955

207
27718
p. 2
absc. 2.9
00000-1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Sistemática y biología de Mycobacterium tuberculosis.

2.-Diagnóstico de la tuberculosis:

a) por métodos indirectos,

b) por métodos directos.

3. La reacción de Middlebrook y Dubos modificada como diagnóstico en los procesos de tuberculosis evolutiva;

a) Fundamento de la reacción.

b) Material.

c) Técnica de la reacción.

d) Resultados obtenidos.

e) Discusión.

f) Conclusiones.

4. Bibliografía.

B. Sistemática y biología de Mycobacterium tuberculosis.

División; Schizophyta.

Clase; Schizomycetes.

Orden; Actinomycetales Buchanan.

Familia; Mycobacteriaceae Chester.

Género; Mycobacterium Lehmann y Neumann.

Especie; Mycobacterium tuberculosis (Schroeter)

Lehmann y Neumann.

Las huellas de la tuberculosis son evidentes en los huesos de algunas momias egipcias, y en las descripciones clínicas que han quedado registradas en algunos antiguos manuscritos hindúes y chinos, se sugiere que la tuberculosis ha azotado a la humanidad desde hace 3000 o 5000 años (Webb, 1931).

Ya en la Edad Moderna, Fracastoro (1484-1553) estableció algunas conclusiones de notable precisión, en lo que concierne a la naturaleza infecciosa de la tuberculosis y a su mecanismo de transmisión.

Sin embargo, la primera demostración experimental se tuvo hasta 1843, suministrada por Kleⁿcke, quien consiguió infectar a un conejo con tuberculosis.

Los experimentos de Villemin, 1865, sirvieron para traer el convencimiento general de que la tuberculosis podía ser transmitida a los animales y, además, de que era posible mantenerla indefinidamente en una sucesión de pasos seriados.

Tal vez Baumgarten, en 1878, logró ver los bacilos en los tejidos infectados; pero, en rigor, la gloria del descubrimiento de la tuberculosis como una enfermedad infecciosa, le corresponde a Ro-

berto Koch, quien fué el primero en aislar el bacilo de la tuberculosis en 1882. A más de esto, Koch logró producir artificialmente la enfermedad en animales, utilizando cultivos puros y, después, al estudiar los animales infectados, consiguió encontrar de nuevo los organismos típicos.

El género Mycobacterium tiene representantes en el suelo, el agua, los vegetales y, aún, en las partículas de polvo del aire. Todos ellos se caracterizan por una reacción de color peculiar, son difíciles de teñir, pero, una vez teñidos, resisten la decoloración ante la acción de los ácidos minerales y, por esto, han recibido el nombre de bacterias ácido-resistentes.

Algunos de estos organismos ácido-resistentes han adquirido la capacidad de producir enfermedad en los animales de sangre fría, mientras que otros se han adaptado específicamente y producen la enfermedad en otros animales, como son los ratones silvestres, las ratas, las vacas, las aves y el hombre.

Existen tres variedades de Mycobacterium tuberculosis:

Mycobacterium tuberculosis var. hominis

Mycobacterium tuberculosis var. bovis.

Mycobacterium avium.

Morfología y tinción

Los bacilos de la tuberculosis son bastante finos, de forma recta o ligeramente curvada, con sus extremos redondeados. Su grosor varía entre 0.2 y 0.5 micras y su longitud es de 1 a 4 micras. Son bacterias aerobias obligadas.

Los bacilos son grampositivos y ácido-resistentes. Son

inmóviles, no esporulados y no tienen cápsula.

Por medio de microfotografías electrónicas se ha demostrado la existencia de una pared celular relativamente gruesa, probablemente rígida; debajo de esta pared se encuentra una membrana citoplásmica definida, dotada de permeabilidad diferencial.

Cuando se tiñen bacilos vivos jóvenes con azul de metileno, se observan gránulos de color azul oscuro que representan, -- probablemente, materiales nucleares.

Los bacilos de la tuberculosis, tanto en los cultivos -- como en las secreciones, se tiñen habitualmente con el método de --- Ziehl-Neelsen, observándose entonces a los bacilos como bastones rojos brillantes sobre fondo azul.

Tanto la reacción coloreada peculiar de los bacilos ácido-resistentes, como la naturaleza de los gránulos de inclusión, han sido estudiadas en detalle por algunos investigadores. La concepción más antigua, según la cual la ácido-resistencia dependería de la existencia de una envoltura cérica situada alrededor de la célula, ya no resulta sostenible en la actualidad. Como el ácido micólico, aislado de los bacilos de la tuberculosis, es ácido-resistente, se pensó por algún tiempo que la presencia de esta sustancia era -- la que explicaba la resistencia del bacilo a la decoloración ante -- la acción del alcohol ácido. Sin embargo, se ha comprobado que el ácido micólico manifiesta únicamente un tenue color rosado cuando se tiñe en películas finas, comparables por su grosor con las del bacilo de la tuberculosis. Yegian y Vanderlinde han demostrado, en 1947, que el protoplasma del organismo, en el cual se encuentra contenido el ácido micólico, se tiñe de un color rosa muy tenue y que, en cam

bio, la mayor parte del colorante que da origen al color rojo brillante que manifiesta el bacilo, se encuentra libre en solución dentro de la membrana citoplásmica.

La integridad de la estructura celular es esencial para el mantenimiento de la ácido-resistencia; ya que el tratamiento químico o mecánico con procedimientos o sustancias que afecten dicha estructura, hace que los organismos se conviertan en no-ácido-resistentes.

La grampositividad de los bacilos de la tuberculosis parece depender de los mismos factores que originan la ácido-resistencia.

En muchas muestras tomadas del pus de los abscesos fríos, de las lesiones granulomatosas de los ganglios linfáticos, de los exudados serosos y de algunos esputos, no es posible encontrar organismos ácido-resistentes, aún cuando tales materiales producen tuberculosis cuando se inoculan a los animales. Tiñiendo tales muestras por medio de la coloración modificada de GEMM, Much de mostró, en 1908, la presencia de gránulos grampositivos en cadenas cortas o en acúmulos irregulares, Much consideró que estas estructuras eran bacilos tuberculosos no-ácido-resistentes y, aún cuando sus observaciones han sido confirmadas muchas veces, existen diferencias de opinión acerca de su significado. Algunos investigadores las con sideran como la etapa filtrable, cocoide, diminuta, dentro del ciclo de vida del bacilo de la tuberculosis.

La consideración de que el bacilo tuberculoso tiene un ciclo de vida complicado, se basa, en parte, en los resultados variables obtenidos en experimentos de filtración y, también en parte, en

las observaciones directas de la degeneración de un bacilo típico - en una masa de gránulos y, luego, de cómo pequeños bastones no-ácido-resistentes de esta masa se transforman finalmente en organismos ácido-resistentes típicos.

Por medio de la cinematografía se ha demostrado que los bacilos jóvenes aumentan de tamaño antes de dividirse, mientras que en los cultivos viejos los bacilos continúan dividiéndose sin agrandarse y producen finalmente pequeñas formas cocoides ácido-resistentes. Cuando se les suministran medios frescos, las formas cocoides se transforman lentamente en bacilos de tamaño común. No se sabe con certeza si un gránulo que haya perdido su membrana citoplásmica pueda regenerarse.

Resistencia

Los bacilos tuberculosos pueden permanecer viables en los medios de cultivo durante un lapso de 2 a 8 meses. Los organismos de cultivo mueren en 2 horas cuando se exponen a la luz directa del sol; pero los organismos contenidos en el esputo de los enfermos requieren una exposición de 20 a 30 horas para morir. Cuando están protegidos de la luz directa del sol, los bacilos viven en el esputo putrefacto durante semanas y en el esputo seco hasta 6 u 8 meses. Las gotitas de esputo secas, adheridas a las partículas de polvo del aire, pueden ser infectantes durante 8 o 10 días. Además, los bacilos de la tuberculosis resisten a los desinfectantes usuales.

Los bacilos tuberculosos no poseen una resistencia mayor al calor húmedo de la que tienen las otras bacterias. Las temperaturas de pasteurización son, por lo tanto, eficaces para eliminar

los de la leche y de los productos lácteos.

Variabilidad

En 1927, Petroff obtuvo una variante de los bacilos de la tuberculosis. En las primeras publicaciones de su laboratorio se cambiaron los términos 'liso' (S) y 'rugoso' (R), que fueron usados habitualmente hasta 1936, ya que se designa con el símbolo S a todas las cepas virulentas, sin tomar en cuenta el que fuesen lisas o rugosas. En 1935, Steenken propuso una nueva terminología, dentro de la cual se conservan las designaciones usuales S y R, para designar cepas lisas y rugosas, respectivamente, pero se añaden otras letras como subíndices. Así, por ejemplo, R_v indica una cepa rugosa virulenta, R_a señala una cepa rugosa avirulenta, R_{in} denota una cepa rugosa intermedia, S_{ch} representa una cepa lisa cromógena avirulenta. Esta clasificación ha sido la utilizada en las publicaciones del laboratorio Trudeau desde 1935 y es la que se acepta actualmente como tipo.

Los bacilos de la tuberculosis producen colonias de una gran diversidad de formas, que difieren como resultado de muy ligeros cambios en el medio. Para poder considerar estable a una variante es necesario subcultivarla durante meses y aún por años.

El cambio de la colonia por efecto de la grasa de huevo fué descubierto por Steenken en 1940. Cuando los bacilos de la tuberculosis se desarrollan en medios que contienen huevo, la grasa de éste convierte artificialmente, de manera mecánica, las colonias R_v y R_a en formas S. Cuando se subcultivan en medios sin huevo, las colonias vuelven a sus formas primitivas.

La cepa relativamente avirulenta R_1 , que ha sido usada durante unos 50 años para producir hipersensibilidad e inmunidad relativa en los animales, se convierte en la forma normal R_{1V} , la cual produce una enfermedad progresiva en los cobayos con silicosis experimental y, luego, se transforma en una segunda variante R_{1a} , que no infecta a los cobayos normales ni tampoco a los que tienen silicosis. La cepa atenuada BCG de Calmette y Guerin, que se usa en la inmunización del hombre contra la tuberculosis, es todavía menos virulenta que la forma R_1 , pero también muestra variantes que remedan morfológicamente a las de R_1 con BCG_a , que es casi completamente avirulenta.

Metabolitos bacterianos

Los tipos humano y bovino del bacilo tuberculoso no tienen endotoxinas ni exotoxinas.

Los seres humanos infectados espontáneamente y los animales infectados experimentalmente dan siempre reacciones violentas a resultas de la inyección subcutánea o intravenosa de pequeñas cantidades de tuberculo proteína. Esto no se debe a la acción de una endotoxina, sino que es producida por la aparición de un estado de hipersensibilidad que es característico de las infecciones tuberculosas.

Generalmente se produce catalasa y se forma H_2S en cantidades variables, por los cultivos de bacilos tuberculosos. Los organismos sintetizan un pigmento llamado ftiocerol. Tanto la cepa humana $H_{37}R_V$ como la bovina Ravenel, sintetizan todas las vitaminas conocidas del complejo B, incluyendo la biotina y el ácido fólico.

Partiendo de las sustancias simples incluidas en el me
dio, estos organismos fabrican fosfátidos, grasas neutras, ceras, -
carbohidratos, proteínas simples y nucleoproteínas. Las sustancias
lipoides constituyen del 25 al 40% del peso seco de los bacilos tu-
berculosos. Muchos de los lípidos y polisacáridos son inocuos y más
complejos que los usualmente encontrados en las plantas superiores
y en los animales. La proporción cuantitativa de las sustancias pro
ducidas, difiere grandemente según el tipo de bacilo estudiado y la
composición del medio de cultivo empleado.

Entre los compuestos orgánicos sintetizados por los ba
cilos de la tuberculosis están : 1) ácido micólico, que es ácido-re-
sistente; 2) ácido tuberculoesteárico y ácido ftioico, siendo este
último estimulante de la producción de células epitelioides; 3) ce-
ras insolubles que provocan la formación de células gigantes de ti-
po de cuerpo extraño; 4) un polisacárido con peso molecular muy ele-
vado, que ejerce acción quimiotáctica sobre los leucocitos polinu-
cleares neutrófilos y precipita en los sueros de animales inmunes
-en un tiempo se pensó que este carbohidrato no era tóxico, ni anti-
génico, pero estudios recientes han demostrado que sí lo es-; 5) u-
na proteína no desnaturalizada con peso molecular elevado, que en -
dosis de 0.02 mg. da cutirreacción positiva en un paciente tuberculo-
so, es antigénica y produce la sensibilidad tuberculínica en los a-
nimales; 6) ácido nucleico, que no es antigénico ni tampoco es tóxi-
co, ni siquiera para los animales tuberculosos.

Estructura antigénica

Por aglutinación, absorción de aglutininas y fijación

del complemento, las bacterias, ácido-resistentes se pueden separar en los tipos siguientes: 1) mamífero; 2) aviario; 3) de animales - de sangre fría; y, 4) saprofitos.

Los tipos humano, bovino y murino no se pueden diferenciar serológicamente. El tipo aviario tiene un antígeno en común -- con los microorganismos humano y bovino, pero, además, posee un antígene específico propio. Los bacilos aviarios han sido separados en subtipos.

Los resultados de una serie de investigaciones indican que la superficie del bacilo de la tuberculosis está compuesta de un complejo lipo-proteína-carbohidrato que estimula la producción de a glutininas y precipitinas, cuando se inyecta a los animales.

2. Diagnóstico de la tuberculosis.

El diagnóstico de la tuberculosis se hace tanto por métodos indirectos como por métodos directos, cuyos resultados se deben tomar conjuntamente para conseguir un diagnóstico satisfactorio.

a) Métodos indirectos

Métodos clínicos. Trastornos respiratorios; generalmen te la puerta de entrada es respiratoria; trastornos digestivos; la segunda puerta de entrada es el tracto digestivo.

Métodos radiológicos: Fluoroscopia, placa.

Combe: Antecedentes familiares.

Pruebas cutáneas: Reacción de Mantoux, Prueba del parche.

Koch, en 1891, encontró en sus primeros experimentos -- que una inoculación primaria de bacilos tuberculosos en la ingle -- de un cobayo daba lugar, después de 10 a 14 días, a la aparición gradual de una inflamación localizada que llegaba a la necrosis y producía una úlcera abierta persistente hasta la muerte del animal. En la necropsia había inflamación y caseificación de los ganglios linfáticos, invasión masiva del bazo, hígado y pulmones, lo mismo que una infección menos extensa de otros órganos. La inyección del mismo número de bacilos tuberculosos a un animal tuberculoso producía una serie de acontecimientos absolutamente diferentes. Después de 24 a 48 horas aparecía en el sitio de la inoculación una inflamación local, seguida por la aparición de una úlcera superficial que curaba prontamente, sin llegar a la caseificación de los ganglios linfáticos adyacentes. Aunque estos animales morían finalmente de tuberculosis, la curación local indicaba la presencia de cierto grado de resistencia. Esta reacción acelerada en el animal infectado y sensibilizado, se conoce con el nombre de "fenómeno de Koch".

La inyección de filtrados de cultivos en caldo o de extractos de bacilos tuberculosos, producía una violenta reacción local y general, pero parecía estimular la curación y, por ello, llevó a Koch a la conclusión errónea de que ciertos productos de los bacilos tuberculosos, a los cuales llamó tuberculinas, podrían curar la tuberculosis. Entre 1891 y 1901, Koch preparó una serie de tuberculinas con fines terapéuticos y, subsiguientemente, fueron investigadas más de 50 clases distintas de tuberculinas. Solamente dos tipos de tuberculinas han sobrevivido a la prueba del tiempo. Estas son la preparación original de Koch, conocida como "tuberculina vie

ja' (O.T.) y la 'proteína purificada derivada' (P.P.D.).

Tuberculina vieja. Los bacilos tuberculosos se cultivan en caldo-peptona-glicerina al 5%, ligeramente alcalino, durante 6 a 8 semanas. Al final de este tiempo el cultivo entero se hierva durante una hora, para matar los bacilos, los cuales se separan por filtración. El filtrado se evapora a 80°C. en baño de maría, hasta reducirlo a la décima parte del volumen original del medio. Además de los productos metabólicos de los bacilos, la tuberculina contiene glicerina, peptona y sales minerales incluidas en el medio original. Para evitar las reacciones positivas falsas, debidas a estos materiales, es indispensable preparar un testigo.

El testigo de la O.T. se obtiene evaporando una parte del medio no sembrado, hasta que quede reducido a una décima parte de su volumen.

La tuberculina es estable en su forma concentrada, pero se hace inestable cuando se diluye en solución salina fisiológica. Las diluciones recientes para prueba clínica deben ser preparadas cada semana.

La dosis de prueba de O.T. está calculada sobre la presunción, evidentemente equivocada, de que 1 c.c. contiene 1000mg. - de tuberculina. Las proteínas activas sólo constituyen una fracción mínima de la O.T.

Las dosis tipo para pruebas de tuberculina y para pacientes sospechosos de tener tuberculosis, son de 0.1 c.c. de una dilución de 1:1000. o sea, de 0.1 mg. de tuberculina. El testigo se diluye de la misma manera que la tuberculina.

Reacción de Mantoux (1908-9). La prueba se efectúa inyectando intracutáneamente 0.1 c.c. de la dilución seleccionada, en un antebrazo y la dilución correspondiente del testigo en el otro. Se dice que la prueba es negativa si no hay reacción después de 24 y 48 horas, o cuando la reacción es igual en ambos antebrazos. Una reacción positiva empieza después de 12 o 24 horas, principiando como una zona de enrojecimiento o inflamación en el sitio de la inyección; y puede progresar hasta hacerse eritema intenso, con induración de varios centímetros de diámetro y con una pequeña zona central de necrosis superficial. La reacción se puede indicar en centímetros de eritema y en induración graduada por signos más. Una gran región con necrosis central se registra como + + + + , mientras que una pequeña zona roja con induración palpable definida se indica con +. Los pacientes que tienen reacciones dudosas, deben someterse nuevamente a prueba, con la dilución inmediata más concentrada.

Prueba del parche. Fué creada por Vollmer (1937-39). Antes de aplicar esta prueba del parche debe limpiarse la piel, quitándole todas las sustancias grasas con acetona. El parche consiste en una franja de tela que contiene un cuadrado de tuberculina seca, unas cuatro veces mayor que la concentración normal de la O.T. original, en cada extremo y, además, un cuadradito de material testigo en el centro de la superficie adhesiva. El parche se mantiene adherido durante 48 horas; luego, se desprende y se esperan otras 48 horas antes de leer los resultados. Este retardo en la lectura de la prueba es esencial, porque así se deja transcurrir el tiempo necesario para que desaparezca la reacción respecto a sustancias -

no específicas existentes en el material adhesivo.

b) Métodos directos

Los métodos de diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis comprenden la investigación de Mycobacterium tuberculosis - en el esputo, la orina, el contenido gástrico, el líquido cefalorraquídeo, el líquido pleural y otros; por medio de frotis, cultivos, inoculación a los animales de laboratorio, biopsias y necropsias.

Frotis. Las extensiones son teñidas por el método de Ziehl-Neelsen, y los bacilos tuberculosos aparecen en forma de bastoncillos rojos, sólidos o vacuolados, rectos o ligeramente curvos; en cambio, las demás bacterias y células estarán teñidas en azul.

Cuando se investiga Mycobacterium en cultivo, es necesario emplear material concentrado, ya sea por el método de la anti-formina, el método de Petroff, el de Gerundo, etc.

Cultivo. Los medios de cultivo que se emplean para el bacilo tuberculoso son el de Lowenstein, el de Dorset (modificado), el de Petraghiani, el de Petroff, el de patata de Corper y Uyei y el de Long-Seibert. Todos estos medios están hechos a base de proteínas como huevo, peptona, leche, carne, las cuales sirven como formadores de protoplasma y, algunos, son productores de energía durante los procesos metabólicos.

La glicerina, que sirve como fuente de carbono, tiene además la propiedad de acelerar el crecimiento de Mycobacterium tuberculosis humano, inhibiendo el desarrollo de Mycobacterium murino

y bovino; de aquí la conveniencia de hacer las siembras en medios con glicerina y sin ella.

Las sales minerales que regulan el equilibrio osmótico entre la bacteria y el medio, son también formadoras de protoplasma.

Los colorantes adicionados a todos estos medios, tales como el verde de malaquita, el violeta de genciana, etc., tienen como objeto el inhibir el crecimiento de cocos contaminantes.

Algunos medios son adicionados con un derivado de un ácido graso de cadena larga (detergente) llamado Tween 80, que altera las condiciones osmóticas por el aumento en la permeabilidad de la membrana, produciendo así un crecimiento más rápido y más abundante.

Inoculación de animales de laboratorio. Los monos y los grandes antropoides son muy sensibles a las infecciones experimentales con cepas humanas y bovinas de bacilos tuberculosos; pero, en cambio, son relativamente resistentes al tipo aviario.

El cobayo y el "hamster" (Cricetus) son los animales más útiles para los estudios de laboratorio. Únicamente se requieren unos cuantos bacilos para infectar a los cobayos y, como son susceptibles por igual a las cepas humanas y bovinas, la inoculación del cobayo es un método de diagnóstico ideal para el descubrimiento de escasos microorganismos en un material contaminado. Antes de hacer las siembras o inocular a los cobayos, el material contaminado debe ser sometido a uno de los métodos de concentración y, después, debe ser tratado con sosa o antibióticos para evitar la flora agregada; luego, se homogeniza y se controla el pH.

Ejecutando previamente la reacción de Mantoux, por lo

general se inoculan simultáneamente dos cobayos, en el tejido subcutáneo de la ingle. Después de 4 a 6 semanas, se observa con frecuencia una induración en el sitio de la inyección, acompañada de la presentación de ganglios linfáticos palpables. Pasado este lapso se debe inyectar intracutáneamente a los animales 0.1 c.c. de una dilución al 5% de O.T. Los animales infectados presentan una reacción local intensa, que evoluciona hasta formar una úlcera abierta; mientras que en los animales no infectados sólo se presenta un eritema transitorio. Los animales que dan reacción positiva con la tuberculina, deben ser sacrificados. Los bacilos se demuestran en los frotis y en los cultivos de las lesiones de la ingle, o por medio de la inoculación de otros cobayos. Los animales que dan reacciones negativas deben ser observados durante otras seis semanas y, entonces, se les vuelve a practicar la prueba de Mantoux.

La inoculación animal es el método más seguro para clasificar los diversos tipos de bacilos de la tuberculosis. El conejo se emplea habitualmente para diferenciar los tipos humano y bovino. Se inyectan dos animales por vía intravenosa, uno con 1 mg. y el otro con 0.01 mg. Los bacilos se obtienen del desarrollo superficial de un caldo de cultivo. Para la inyección son secados con papel filtro estéril, se les pesa y se les suspende en 2 a 3 c.c. de solución salina fisiológica. Si el cultivo es de tipo bovino, ambos conejos mueren entre 6 y 8 semanas después. Si el microorganismo es de tipo humano, el animal que recibe la dosis menor sobrevive.

Biopsia. Generalmente se toma un ganglio que presente caracteres patológicos y se le somete al estudio por medio de prue-

bas directas, como son: frotis, cultivo e inoculación en animales susceptibles de contraer la enfermedad.

Necropsia. Se practican los mismos métodos que para la biopsia, en todos los órganos lesionados macroscópicamente.

3. La reacción de Middlebrook y Dubos modificada como diagnóstico en los procesos de tuberculosis evolutiva.

Desde hace varias décadas se ha venido tratando de obtener un método de laboratorio que permita hacer un diagnóstico seguro de la tuberculosis, sobre todo de la tuberculosis evolutiva, - en aquellos casos en que no se puede demostrar el agente causal por métodos ordinarios; o bien, cuando los métodos clínicos y de laboratorio no permiten precisar si un proceso aparentemente tuberculoso ya se encuentra completamente curado o aún está en actividad. Además, se busca que dicho método de laboratorio también se pueda utilizar como medio de diagnóstico diferencial de otras enfermedades - que puedan ser confundidas con la tuberculosis en alguna de sus diferentes formas clínicas.

En 1900, Bordet y Gengou demostraron que es posible hacer la reacción de fijación del complemento, usando como antígeno a los bacilos tuberculosos, y dicha reacción pudo ser considerada aparentemente como específica.

Seis años más tarde, Wassermann practicó una reacción similar, pero, en lugar de utilizar como antígeno a los bacilos tuberculosos, empleó tuberculina.

Gardner, Middlebrook y Dubos, en 1948, dieron a conocer un nuevo método para la investigación de la tuberculosis, consistente en la reacción de hemoaglutinación, que es específica para dicha enfermedad.

Una modificación de este método, publicada en 1950 por Nancy B. Scott y David T. Smith, es la que usamos como base para efectuar este trabajo. Esta modificación de la técnica original hace que sea más accesible para los hospitales y laboratorios que no cuentan con personal adiestrado en la producción de los extractos especiales desglicerinados de bacilos tuberculosos.

a) Fundamentos de la reacción

Se sabe que los glóbulos rojos son sensibilizados por ciertas sustancias, de tal manera que se vuelven específicamente a glutinables a los anticuerpos de dichas sustancias.

Si se ponen glóbulos rojos de carnero en contacto con tuberculina y, después, estos mismos glóbulos rojos son puestos en contacto con suero sanguíneo de un individuo que padezca tuberculosis, es decir, con un suero en el cual haya anticuerpos para los productos del bacilo tuberculoso, entonces, los glóbulos rojos de carnero se aglutinan, quedando demostrada así la infección tuberculosa.

b) Material

La prueba fué realizada con 100 niños, tomados tanto entre los internados en las diferentes salas del Hospital Infantil, como de los asistentes a la Consulta Externa del propio Hospital, - cuyas edades oscilaban entre menos de 1 año hasta 14 años.

Para llevar a cabo la reacción se usaron los siguientes materiales:

I. Tuberculina.

II. Glóbulos rojos de carnero.

III. Solución de Alsever.

IV. Solución salina isotónica reguladora (buffer).

V. Suero de cada paciente.

I. Tuberculina

Se empleó tuberculina vieja (O.T.), sólo que en una concentración cuatro veces mayor que la normal (4xO.T.), preparada por el Instituto Nacional de Higiene. Y, para evitar los efectos hemolíticos de la glicerina, se hicieron diluciones con solución salina isotónica reguladora.

Se hicieron pruebas de hemólisis utilizando tuberculina y diluciones seriadas de glóbulos rojos de carnero normales (no sensibilizados). Se encontró que no había hemólisis con diluciones menores de 1:8; por lo cual se concluyó que dicha tuberculina era no-hemolítica para los glóbulos rojos de carnero normales (no sensibilizados).

II. Glóbulos rojos de carnero

Los glóbulos rojos se usaron como antígeno y se sensibilizaron con tuberculina vieja (O.T.).

III. Solución de Alsever

La solución de Alsever que se utilizó para la conservación de los glóbulos rojos de carnero, tiene la fórmula siguiente:

Dextrosa 2.05 gr.

Citrato de sodio 0.80 gr.

Cloruro de sodio 0.42 gr.
Agua 100 c.c.

La solución final esterilizada tiene un pH de 6.1.

IV. Solución salina isotónica reguladora (buffer)

Fórmula;

Fosfato sódico 9.46 gr.
Fosfato potásico 9.06 gr.
Cloruro de sodio 8.50 gr.
Agua 1000 c.c.

Esta solución tiene un pH de 7.3 a 7.4.

V. Suero de cada paciente

El suero de cada paciente fué inactivado por el calor y de él se removieron los anticuerpos heterófilos, normalmente presentes en el suero humano y que pueden aglutinar a los glóbulos rojos normales (no sensibilizados) de carnero. La absorción de los mencionados anticuerpos heterófilos se hizo poniendo al suero en contacto con glóbulos rojos de carnero no sensibilizados.

c) Técnica de la reacción

I. Preparación de los glóbulos rojos de carnero lavados

Los glóbulos rojos de carnero, inmediatamente después de ser obtenidos, son puestos en solución de Alsever, conservándolos en ella hasta el momento de ser utilizados.

Estos glóbulos rojos son centrifugados durante 10 minutos a 1800 r.p.m., quitando el líquido sobrenadante con una pipeta.

El depósito así obtenido se lava tres veces consecutivas, empleando para ello 6 volúmenes de solución salina.

Después del último lavado, se centrifugan nuevamente - las células durante 20 minutos, a 2000 r.p.m., quitando todo el sobrenadante que sea posible con una pipeta pequeña.

Estos eritrocitos son usados en la prueba como "glóbulos rojos lavados en paquete".

II. Preparación del antígeno

La tuberculina se diluye en la relación de 1:15, con solución salina isotónica; para lo cual se mezclan 0.4 c.c. de tuberculina y 5.6 c.c. de solución salina.

Se utiliza la dilución arbitraria de 1:15, porque se sabe que las titulaciones de 1:20 o mayores producen una sensibilización satisfactoria.

A la tuberculina diluida se le agrega 0.1 c.c. de "glóbulos rojos lavados en paquete" y se incuba durante 2 horas en baño de maría, a 37°C. Esta mezcla se sacude cuidadosamente a intervalos de 15 minutos aproximadamente.

Se emplea la dilución de 0.1 c.c. de "glóbulos rojos lavados en paquete" en 6 c.c. de tuberculina diluida, tomando en cuenta que en diferentes pruebas se ha podido observar que concentraciones mayores de 0.1 c.c. de "glóbulos rojos lavados en paquete" en 4 c.c. de solución de tuberculina, no producen una sensibilización completa y dan por resultado títulos bajos de hemoaglutinación con sueros de tuberculosos, cuyos anticuerpos se encuentren titulados previamente.

Al ser retirada del baño de maría, la suspensión de glóbulos rojos se centrifuga a baja velocidad, 1000 r.p.m., duran--

te 6 minutos. Se emplea esta baja velocidad para evitar la formación de un depósito compacto de glóbulos rojos, que después sería difícil volver a suspender sin hemolizar algunas de las células.

Luego, se procede a lavar los glóbulos rojos con 6 c.c. de solución salina, por 3 veces consecutivas y, finalmente, se les suspende en 50 c.c. de la misma solución.

Esta suspensión de glóbulos rojos al 0.2% es la que se utiliza como antígeno; con la circunstancia de que es posible conservarla a 4°C. durante tres días.

III. Absorción del suero del paciente

El suero del paciente se obtiene dejando reposar la sangre, una vez que se retrae el coágulo.

A 1 c.c. del suero del paciente se le añade 1 c.c. de solución salina isotónica reguladora. Esta mezcla es inactivada a 65°C. durante 3 minutos y, luego, se le deja enfriar a la temperatura ambiente.

Después, se le agregan 0.2 c.c. de "glóbulos rojos lavados en paquete" no sensibilizados y se deja reposar la mezcla durante 20 minutos. Entonces, se remueven las células por centrifugación, a 2500 r.p.m. durante siete minutos. Al terminar, se adicionan otros 0.2 c.c. de "glóbulos rojos lavados en paquete" no sensibilizados y se repite la operación anterior.

Como ya lo dijimos, la absorción del suero del paciente por medio de los "glóbulos rojos de carnero lavados en paquete" no sensibilizados, permite la eliminación de los anticuerpos heterófilos que son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de carnero normales.

Este suero así preparado puede ser almacenado en el refrigerador por tiempo indefinido, sin que se produzca alteración de los títulos de anticuerpos para los glóbulos rojos sensibilizados.

IV. Prueba de hemoaglutinación (Cuadro 1)

Se hacen dos series de diluciones con el suero absorbido, empleando tubos y gradillas semejantes a los usados para la reacción de Wassermann.

En el primero y segundo tubos se ponen 0.4 c.c. de suero absorbido. Las diluciones seriadas se hacen distribuyendo el contenido del segundo tubo en 6 tubos que contengan cantidades iguales de solución salina.

A los tubos que contienen 0.4 c.c. de suero absorbido diluido se les añaden 0.4 c.c. de la suspensión de "glóbulos rojos de carnero lavados en paquete" al 0.2% y sensibilizados con tuberculina (antígeno).

Se utilizan dos tubos de control, uno con 0.4 c.c. de solución salina isotónica reguladora (buffer) y 0.4 c.c. de la suspensión de glóbulos rojos que se ha empleado como antígeno, el otro tubo con 0.4 c.c. de suero absorbido en una dilución de 1:2 y 0.4 c.c. de una suspensión de glóbulos rojos de carnero lavados y no sensibilizados al 0.2%.

Cada vez que se prueba un suero no conocido, se incluye un suero negativo y uno positivo ya conocidos. El suero negativo se obtiene de individuos con pruebas cutáneas negativas de tuberculina.

Los tubos se agitan e incuban a 37°C. en baño de maría, durante tres horas. Después de quitarlos del baño de maría se vuel-

CUADRO 1

Tubo Núm.	Suero absorbido	Antígeno	Solución salina isotónica reguladora	Dilución	Glóbulos rojos no sensibilizados
1	0.4 c.c.	0.4 c.c.		1 ; 2	
2	0.4 c.c.	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 4	
3	0.4 c.c. (1 ; 2)	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 8	
4	0.4 c.c. (1 ; 4)	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 16	
5	0.4 c.c. (1 ; 8)	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 32	
6	0.4 c.c. (1 ; 16)	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 64	
7	0.4 c.c. (1 ; 32)	0.4 c.c.	0.4 c.c.	1 ; 128	
Control 1		0.4 c.c.	0.4 c.c.		
Control 2	0.4 c.c. (1 ; 2)				0.4 c.c.

ven a agitar y se dejan a la temperatura ambiente por toda la noche. Y, a la mañana siguiente, se hace la lectura en la forma acostumbrada para este tipo de reacción.

d) Resultados obtenidos

Las reacciones fueron practicadas en niños con tuberculosis activa pulmonar y extrapulmonar, en niños vacunados con B.C.G., en niños cuyo diagnóstico era dudoso con respecto a la tuberculosis y en un pequeño grupo de niños que padecían otras enfermedades pero no tuberculosis.

Para la clasificación de los casos se tomaron únicamente los diagnósticos finales. En la mayoría de los niños tuberculosos, esta enfermedad quedó comprobada por los resultados obtenidos en el laboratorio clínico o por el estudio histopatológico de biopsias y necropsias. En aquellos niños sobre los cuales no fué posible hacer la comprobación de la tuberculosis, el diagnóstico se hizo tomando en cuenta la fuente de contagio, el examen clínico, las reacciones tuberculínicas, los estudios radiológicos y otros exámenes de laboratorio (sedimentación globular, biometría hemática, etc.).

Se hicieron diluciones seriadas del suero del enfermo en 7 tubos, en relaciones de 1:2 a 1:128, contando con los respectivos tubos de control. En cada tubo en que se produjo aglutinación, se leyó ésta, marcando el grado de aglutinación por medio de cruces, desde + hasta + + + ; tomando como título máximo de aglutinación la del tubo de mayor dilución con una aglutinación no menor de una +.

Con objeto de mostrar los resultados totales obtenidos, se dividieron en cinco grupos:

- 1o. Niños con tuberculosis pulmonar activa.
 - 2o. Niños con tuberculosis extrapulmonar ectiva.
 - 3o. Niños vacunados con B.C.G.
 - 4o. Niños no tuberculosés activos, Tuberculino-positivos. (Infección tuberculosa, no enfermedad).
 - 5o. Niños no tuberculosos, tuberculino-negativos.
- Cada uno de estos grupos se subdividió por edades.

1er. Grupo. Niños con tuberculosis pulmonar activa (Cuadro 2).

Se practicaron 57 reacciones, obteniéndose datos positivos de presencia de hemoaglutinina circulante en 53 de ellos y únicamente reaccionaron negativamente 4 casos (7%); de estos últimos, con excepción de un solo caso de 12 años, todos eran niños de menos de 2 años de edad.

De los 53 casos (93%) que dieron reacción positiva, a título de 1:2 o mayor, sólo dos de ellos presentaron reacciones tuberculínicas negativas; siendo los títulos de hemoaglutinación de 1:16 y 1:32 respectivamente.

En seis de estos niños se repitió la reacción, obteniéndose títulos semejantes en cuatro de ellos; en los otros dos casos, los títulos resultaron con una ligera elevación en la segunda prueba.

En resumen, puede decirse que 49 niños con tuberculosis pulmonar activa (85.96%) reaccionaron positivamente a títulos de significación clínica. En algunos ^{de estos} casos había, asociadas a la tuberculosis pulmonar, otras localizaciones tuberculosas (óseas, articulares y meníngeas).

CUADRO 2

NIÑOS CON TUBERCULOSIS
PULMONAR ACTIVA

TITULOS DE HEMAGLU- TINA- CION	E D A D - - - - - AÑOS												TOTAL	
	Me- nos de 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
NEG.	1	1	1										1	4
1 : 2	1	1												2
1 : 4	1						1							2
1 : 8		4	2			1				1			1	9
1 : 16	2	3	2	2	2	1	1	2				2	1	18
1 : 32		2	2	1		1				1			1	8
1 : 64		1	2	4	1		1			1	2		1	13
1 : 128													1	1
TOTAL	5	12	9	7	3	3	3	2		3	2	2	6	57

En los niños menores de dos años los títulos obtenidos fueron relativamente más bajos que los encontrados entre los niños mayores de dos años; entre estos últimos, hubo diez casos cuyos títulos fueron de 1:64 y un caso con titulación de 1:128.

2o. Grupo. Niños con tuberculosis extrapulmonar activa (Cuadro 3).

Se estudiaron trece niños, todos ellos mayores de 7 años, y en todos se obtuvieron reacciones de hemoaglutinación positivas a títulos de 1:16 o superiores; siendo el más frecuente el título de 1:32, con 5 casos. La mayoría de estos niños padecía de lesiones tuberculosas osteoarticulares, las cuales se comprobaron por el estudio histológico de biopsias tomadas durante las intervenciones quirúrgicas o de ganglios satélites a las regiones afectadas. Todos estos casos presentaron, además, reacciones tuberculínicas positivas.

3er. Grupo. Niños vacunados con B.C.G. (Cuadro 4).

Todos los niños incluidos en este grupo recibieron la vacuna B.C.G. por vía oral. El niño de menor edad tenía seis meses y el mayor era de 3 años.

Se estudiaron 14 niños. Tres de ellos dieron reacciones negativas (21.43%), siendo menores de un año en los tres casos. Diez dieron por resultado reacciones de hemoaglutinación de 1:8 o mayores (71.43%). El otro caso presentó reacción de Mantoux negativa, pero con reacción de hemoaglutinación positiva al 1:32.

Otros casos de niños vacunados con B.C.G. quedaron in-



FALCÓN
BT

CUADRO 3

NIÑOS CON TUBERCULOSIS
EXTRA-PULMONAR ACTIVA

TITULOS DE HEMAGLU- TINACION	EDAD - - - - - AÑOS								TOTAL
	7	8	9	10	11	12	13	14	
NEG.									
1 : 2									
1 : 4									
1 : 8									
1 : 16				1		1	1	1	4
1 : 32	2			1	1	1			5
1 : 64	1						1		2
1 : 128				2					2
TOTAL	3			4	1	2	2	1	13

CUADRO 4

NIÑOS VACUNADOS CON B.C.G.

TITULOS DE HEMAGLU- TINACION	E D A D - - - A Ñ O S				TOTAL
	menos de 1	1	2	3	
NEG.	3				3
1 : 2					
1 : 4	1				1
1 : 8	1	1		1	3
1 : 16	1	3			4
1 : 32	3				3
1 : 64					
1 : 128					
TOTAL	9	4		1	14

cluidos en el grupo de tuberculosis pulmonar, ya que en su necropsia se encontraron signos de invasión tuberculosa generalizada.

4o. Grupo. Niños no tuberculosos activos, tuberculino-positivos (Cuadro 5).

Se estudiaron ocho niños y únicamente en uno de ellos se obtuvo reacción de hemoaglutinación negativa (12.50%). En el resto de los casos las reacciones fueron positivas. Seis de estas últimas a título de 1:8 o mayor (75%); el título menor fué de 1:4 en un niño (12.50%); el mayor número de reacciones positivas, tres niños (37.50%), fué a título de 1:16.

En este grupo se incluyó un niño que volvió al hospital después de haber padecido tuberculosis miliar y que en el momento de hacerle el presente estudio se consideró como curado. Fué el único de este grupo que presentó reacción de hemoaglutinación negativa.

5o. Grupo. Niños no tuberculosos, tuberculino-negativos (Cuadro 6).

Se practicó la reacción de hemoaglutinación en 8 niños, de los cuales 3 dieron reacciones negativas (37.5%) y 5 casos produjeron reacciones positivas (62.5%) con títulos de 1:4 o mayores. El título superior, alcanzado en dos casos, fué de 1:32.

2) Discusión

En el grupo de tuberculosis pulmonar activa encontramos que las cifras obtenidas corresponden aproximadamente a las observa-

CUADRO 5

NIÑOS NO TUBERCULOSOS
TUBERCULINO-POSITIVOS

TÍTULOS DE HEMAGLU- TINACION	EDAD - - - - - AÑOS												TOTAL	
	me- nos de 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
NEG.					1									1
1 : 2														
1 : 4								1						1
1 : 8								1						1
1 : 16	1				1	1		1						3
1 : 32										1				1
1 : 64													1	1
1 : 128														
TOTAL	1				1		1	2	1	1			1	8

CUADRO 6

NIÑOS NO TUBERCULOSOS
TUBERCULINO-NEGATIVOS

TITULOS DE HEMAGLU- TINACION	EDAD - - - - - AÑOS													TOTAL	
	me- nos de 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
NEG.		1	2												3
1 ; 2															
1 ; 4				1											1
1 ; 8															
1 ; 16			1										1		2
1 ; 32				1		1									2
1 ; 64															
1 ; 128															
TOTAL		1	3	2		1							1		8

das por otros autores; aunque, tal vez, sean ligeramente superiores en nuestro estudio.

En los niños con tuberculosis extrapulmonar activa, en contramos que todos ellos presentaron títulos significativos desde el punto de vista clínico. Esto representa un resultado contrario a los anotados por otros autores; aunque es de advertir que los títulos fueron bajos, ya que su mayor frecuencia la tenemos en 1:32.

Si se unen los dos grupos de tuberculosis activa, pulmonar y extrapulmonar, se forma un total de 80 casos estudiados. De éstos, 62 casos (88.57%) presentaron hemoaglutinación de 1:8 o mayor, es decir, que las cifras corresponden a las encontradas en otros estudios. El título medio obtenido fué de 35.22.

Si hacemos lo propio con los grupos de no tuberculosos con reacciones tuberculínicas positivas y negativas, tenemos que de 16 niños estudiados, 10 presentaron títulos de hemoaglutinación mayores de 1:4, o sea el 62.5%. Esta cifra es, comparativamente, muy alta; ya que las cifras más elevadas que se dan en los trabajos con sultados son de 40 a 45% y, por término medio, varían entre 25% y - 35%.

El título medio obtenido fué de 21.33, que es notablemente menor que el correspondiente a los pacientes de tuberculosis activa.

En el grupo de los niños vacunados con B.C.G., las cifras corresponden a las ofrecidas en otros trabajos, esto es, son muy semejantes a las que se observan en individuos normales. Los tí tulos fueron bajos, no mayores de 1:32 en nuestro estudio.

Respecto al factor edad, podemos decir que se obtuvie-

ron reacciones positivas en niños menores de 2 años y aún en niños de pocos meses de edad, con títulos hasta de 1:64; lo cual resulta contrario a los datos conseguidos en otros trabajos.

Por lo anteriormente apuntado y tomando en cuenta lo observado por otros autores, podemos decir que la reacción de hemoaglutinación de Middlebrook y Dubos, así como sus modificaciones, no constituye una reacción de valor clínico apreciable, ya que se pueden encontrar reacciones positivas a títulos considerados como de significación clínica, en individuos sanos y en un tanto por ciento bastante considerable. Aún cuando el mayor número de casos positivos y los títulos más altos se observan en individuos con tuberculosis activa, sin embargo, también se pueden encontrar títulos elevados en individuos no tuberculosos, lo cual hace descender mucho el valor de la reacción. Por todo esto, debemos considerar muy dudoso que esta reacción sea un método certero para el diagnóstico de la tuberculosis o un índice seguro de actividad tuberculosa.

Podemos agregar que la reacción sí es específica, ya que en las pruebas experimentales no se encontró ningún otro germen, con excepción del bacilo de Hansen, que posea las mismas propiedades antigénicas. Pero esta especificidad pierde valor por el hecho de haber encontrado un elevado tanto por ciento de reacciones positivas falsas.

En muy pocos casos esta reacción podría servir de ayuda al clínico; desde luego, siempre con las reservas pertinentes y conjugándola con los hallazgos clínicos, los estudios radiológicos y otras pruebas de laboratorio.

En resumen, se trata de una reacción de poco valor práctico

tico, puesto que sólo se puede efectuar en hospitales y laboratorios de gran magnitud, lo cual no se encuentra al alcance de todos los clínicos. A esto se añade el defecto del número relativamente elevado de reacciones positivas o negativas falsas que se pueden encontrar.

f) Conclusiones

1a. La reacción de hemoaglutinación de Middlebrook y Dubos modificada, es específica para el Mycobacterium tuberculosis y para otro Mycobacterium con las mismas propiedades antigénicas -- (Mycobacterium leprae).

2a. Tiene escaso valor práctico, dado el alto tanto -- por ciento de reacciones positivas y negativas falsas.

3a. En términos generales, no puede ser tomada como índice de actividad tuberculosa, ni tampoco del grado de ésta.

4a. La ausencia, o la presencia no demostrable, de anticuerpos circulantes no descarta la posibilidad de la tuberculosis activa.

4. Bibliografía.

ADOCK, JOHN, M.D., HALEY, RAPHAEL., M.M. and DAVEY - WINTROP N., M.D., The Middlebrook hemagglutination test for tuberculosis and evaluation in normal subjects and in patients with tuberculosis. "The Journal of Laboratory and Clinical Medicine", 38, -- 734-736, 1951.

ANDERSON, H. W., PLATAU R.V., SPATAFORA, M. S., Middlebrook-Dubos Hemagglutination reaction; A study of the test in ---- children. "American Journal of Diseases of Children", 83, 71-76, - Jan., 1952.

BREED, ROBERT S. et a., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, Williams & Wilkins Co., sixth edition, 1948, págs. 875-891.

FLEMING, J. W., RUNYON, E. H., COMMINGS, M. M., An evaluation of the hemagglutination test for Tuberculosis. "American - Journal of Medicine", 10: 700-704, Jun., 1951.

GARDNER, MIDDLEBROOK, The Hemagglutination test in tuberculosis. "American Review of Tuberculosis", 62: 223-229, Aug., 1950.

KIRBY, WILLIAM M., BURNELL, JAMES M., and O'LEARY BETTY, Evaluation of the Hemagglutination Reaction in diagnosis of active - tuberculosis. "American Review of Tuberculosis", 64: 69-71, Jul., - 1951.

KOLMER, JOHN A. y BOERNER, FRED, Métodos de Laboratorio Clínico. México, Editorial Interamericana, 2a. edición española, -- 1948, págs. 490-496.

MIDDLEBROOK, GARDNER and DUBOS, Specific serum aggluti

nation of erythrocytes sensitized with extracts of Tubercle Bacilli. "Journal of Experimental Medicine", 88: 521-528, Nov., 1948.

MOLLOW, MOLLIE, KOTT, TADEUS J., Comparative study of the test for antibodies and its hemolytic modification in Tuberculosis. "American Review of Tuberculosis", 65: 223-226, May., 1951.

RIEX, GUNES, TACQUET A., Le phénomène a l'Hemolyse conditioné dans la tuberculose. "Annales de l'Institut Pasteur", 81: - 142-149. Aout, 1951.

ROTHBARD, SIDNEY, M.D., A serological test in Tuberculosis. Experimental and Clinical Observations. "Medical Clinics of North American", 35: 603-606, Mar., 1951.

SCOTT, NANCY B. and SMITH, DAVID T., A simple modification of Middlebrook and Dubos Hemagglutination test, for serum antibodies to products of Tubercle Bacilli. "American Journal of Laboratory and Clinical Medicine", 35: 300-303, Feb., 1950.

SMITH, DAVID T. et a., Zinsser's Textbook of Bacteriology. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1948, págs. 375-403.

SMITH, DAVID T., SCOTT, NANCY B., Clinical interpretation of the Middlebrook-Dubos Hemagglutination test. "American Review of Tuberculosis", 62: 220-223, Aug., 1952.